R. ISTITUTO SUPERIORE AGRARIO DI PISA

LABORATORI DI PATOLOGIA VEGETALE

E DI BATTERIOLOGIA AGRARIA

R. OSSERVATORIO REGIONALE DI FITOPATOLOGIA

28.

R. PEROTTI e G. BONUCCELLI

RAPPORTI TRA INVOLUZIONISMO E VIRULENZA NEI RIGUARDI DEL "MACROSPORIUM COMMUNE" Rabh.

PISA

STABILIMENTO EDITORIALE VALLERINI

1929 - VII

28.

R. PEROTTI e G. BONUCCELLI

RAPPORTI TRA INVOLUZIONISMO E VIRULENZA NEI RIGUARDI DEL "MACROSPORIUM COMMUNE„ Rabh.

I rapporti tra variabilità morfologica e variabilità fisiologica nei microrganismi sono molto poco indagati. Alle modificazioni della forma, di norma, si ritiene che debbano associarsi alterazioni delle funzioni; talvolta però le deviazioni di queste non sembrano trovare la loro corrispondenza in quelle, poichè esse non sono avvertite e, se possono non ammettersi, non sono neppure da escludersi.

Ciò costituisce una prima, non lieve difficoltà nello studio dei rapporti in questione.

Inoltre, i risultati della variabilità nei microrganismi sono molto male definiti. Per essa si ottengono a volte prodotti di una certa fissità, indipendentemente dalla natura del mezzo nutritivo; prodotti che sono stati indicati come « varietà » propriamente dette. Fra essi sono molti agenti patogeni, i quali traggono le loro caratteristiche, e fra queste, spesso, la virulenza, da cause intrinseche od estrinseche inafferrabili.

Si ottengono, a volte, altre variazioni morfologiche incostanti, perchè facilmente si ripristina la norma, come con grande facilità questa è stata abbandonata per semplice modificazione del substrato colturale; variazioni le quali si qualificano « forme » od anche « razze », forse, inesattamente, se si ha da tener conto del valore di questo termine nei confronti della variabilità delle specie organiche superiori.

Infine, sono distinte a parte le « forme d' involuzione » quali risultano sporadicamente negl' individui delle specie nelle vecchie colture, dove il mezzo viene in modo singolare alterato dai prodotti reflui del metabolismo degli organismi stessi.

Una seconda difficoltà quindi viene a presentarsi nella definizione delle varietà, delle forme o razze e delle forme involutive, che è, in fondo, artificiosa e non potrebbe non esserlo dato che confini netti tra fatti e cose in Natura, sempre, non sono determinabili. Non si può con esattezza dire quando ad un prodotto di variazione microrganica è da attribuirsi l'uno o l'altro significato terminologico; ed in uno studio sui rapporti in questione, quale è quello che viene presentato, la difficoltà è da superarsi non altrimenti che con una denominazione convenzionale.

Riterremo quindi i risultati della specie, che verrà cimentata in vario modo nelle sue relazioni di nutrizione, come forme involutive e parleremo quindi d' *involuzionismo.*

Le variazioni fisiologiche sono molte, tante quante sono le funzioni dei microrganismi che sono numerosissime: talune più frequenti, altre meno. Tra quelle maggiormente interessanti nei riguardi dei compiti di questi Laboratori, è certo la *virulenza,* che poco innanzi ricordavamo, e costituisce un fenomeno molto oscuro non nelle manifestazioni, quanto nelle origini. Non sappiamo, infatti, renderci ragione dell' insorgere di attività patogeniche in alcune specie che ordinariamente non le presentano; nè dell'esaltarsi di alcuni casi di parassitismo nel tempo o nello spazio, nè della esplosione di talune epidemie come della loro più meno rapida o lenta scomparsa.

Qualsiasi indagine al riguardo potrebbe costituire un utile contributo alla conoscenza di questi fenomeni.

La virulenza di un microrganismo, in genere, è attribuita all' insorgere naturale e, per ora, incontrollabile di sue varietà nel senso proprio innanzi detto. Non è ben determinato se e quanto essa sia dovuta al mezzo di nutrizione non ostante vi sia qualche ricerca, che è ora fuori luogo di specificare, e porti un qualche utile contributo, al riguardo, nel senso positivo.

Manca però ogni argomento per affermare i rapporti tra l' involuzionismo e l' entità della virulenza stessa, il che se fosse possibile di determinare getterebbe qualche luce sull'acquisizione come sulla eliminazione del parassitismo di determinate forme e delle sue manifestazioni epidemiche, normalmente, cicliche.

Il saprofita come il parassita, in Natura, per condizioni ambientali svariate, possono degenerare e dar quindi luogo a forme involutive; queste potrebbero in un caso, per far salva la perpetuazione della specie, manifestare il parassitismo, nell' altra temporaneamente perderlo per nuovamente acquistarlo dopo un determinato periodo di tempo.

Lo studio, adunque, che ci siamo proposti ha per iscopo di determinare artificialmente, a mezzo di una svariata nutrizione, l'involuzionismo di una specie microrganica fungina generalmente saprofita od avente deboli proprietà parassitarie; di eseguire inoculazioni in conveniente numero su piante sane e di determinare lo svolgimento dei fenomeni patologici eventualmente manifestantisi.

La specie prescelta fu il *Macrosporium commune,* Rabh.

Essa fu isolata su piastre di agar fagiuoli, da foglie di *Populus canadensis,* attaccate da *Ascochyta populorum* (Sacc. e Roum.) Voglino.

I.

Una prima ricerca venne istituita per determinare le esigenze nutritive del *Macrosporium,* allevandolo in soluzioni a composizione fissa e controllabile e rilevando le forme involutive che eventualmente si fossero manifestate nelle vecchie colture od in quelle in cui lo sviluppo non fosse stato abbondante e normale.

Le soluzioni impiegate furono quelle di cui al § 100 della *Tecnica di Biologia Vegetale applicata all'Agricoltura* di uno di noi; ed i risultati colturali, macroscopicamente apprezzati, vennero espressi con la scala numerica ivi adottata, in cui lo zero indica assenza di sviluppo ed il 5 sviluppo massimo.[1]

Essi vengono riportati nella seguente

TABELLA I.

N. della soluzione	Sviluppo del "Macrosporium commune" nelle soluzioni costanti			
	OSSERVAZIONI			
	1ª	2ª	3ª	4ª
I	0,5	0,5	0,5	0.5
II	2,5	2,5	3 —	3 —
III	2 —	2 —	2,5	4,5
IV	4,5	4,5	4,5	4,5
V	3,5	4 —	4 —	5 —
VI	4 —	4 —	4 —	4 —
VII	0,5	0,5	0,5	0,5
VIII	1 —	1 —	1 —	1 —
IX	4,5	4.5	4,5	4,5
X	3,5	4,5	4,5	4,5
XI	3,5	5 —	5 —	5 —

[1] PEROTTI R. — *Tecnica di Biologia Vegetale applicata all'Agricoltura.* - Roma, 1928.

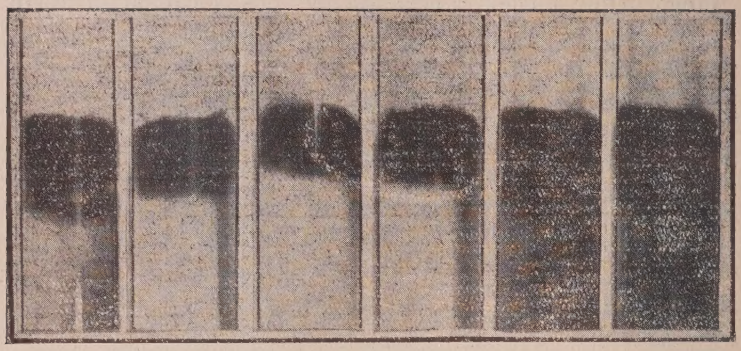
Si volle anche non trascurare l'esame dello sviluppo del fungo nelle soluzioni a composizione non controllabile fissate nella stessa « Tecnica »; ed i risultati nuovamente ottenuti sono gli altri riportati nella

TABELLA II.

N. della soluzione	Sviluppo del "Macrosporium commune„ nelle soluzioni non costanti			
	OSSERVAZIONI			
	1ª	2ª	3ª	4ª
I	1 —	2 —	2 —	2,5
II	5 —	5 —	5 —	5 —
III	4,5	5 —	5 —	5 —
IV	3 —	3 —	3,5	3,5
V	0	0	0	0

È dimostrato dalla I tabella che lo sviluppo del Macrosporio è favorito nelle soluzioni IV, VI, IX e X; e se ne deduce che questo fungo, come sorgente di azoto, utilizza prevalentemente azoto nitrico ed ammoniacale (tartrato); come sorgente di carbonio, saccarosio, glucosio e glicerina.

L'esame dei risultati della tabella II, che furono i migliori per le soluzioni II e III, conferma l'azione favorevole dei carboidrati che rende maggiormente sensibile l' utilizzazione dell'azoto proteico.



IV c, VI c, IX c, X c, II n. c, III n. c.

FIG. 1.

Aspetto dello sviluppo del Macrosporium commune, *Rabh. in soluzioni nutritive di diversa composizione.*

La Fig. 1 dimostra l' aspetto delle colture nei liquidi nutritizi anzidetti.

II.

Ciò che in modo particolare interessava ai fini dello studio progettato era l' esame microscopico della specie per determinare le variazioni delle forme ottenutesi nelle diverse condizioni colturali in cui essa fu cimentata.

Tale esame fu compiuto, non soltanto a mezzo della osservazione della morfologia del micelio e delle spore, ma anche procedendo a misurazioni del diametro del primo e delle dimensioni longitudinali e trasversali delle altre.

I reperti ne sono consegnati nella

Tabella III.

Esame microscopico delle colture di *Macrosporium commune*.

N. della soluzione nutritizia	MICELIO		SPORE	
	diametro μ	FORMA	dimensioni medie μ	forme
Costanti				
I	3,2 — 4,8	ramificata a setti ravvicinati	19,2 × 9,6	ovoidale, clavata
II	1,6 — 6,4	filamentosa, talvolta rigonfiata, irregolare; ramificazioni e setti ravvicinati	28,8 × 9,6	ovoidale, clavata irregolare
III	3,2 — 6,4	irregolarmente rigonfiata; ramificata	assenza	di sporulazione
IV	3,2 — 6,4	regolare	32,5 × 12,8	ovoidale, clavata, a volte irregolare
V	3,2 — 4,8	filamentosa, non ramificata a setti ravvicinati	36,2 × 8,0	clavata, leggermente irregolare
VI	3,2 — 4,6	filamentosa, raramente rigonfiata e ramificata	40,0 × 8,0	ovoidale, clavata, irregolare
VII	1,6 — 4,8	generalmente rigonfiata e molto irregolare a setti variamente distanziati	assenza	di sporulazione
VIII	3,2 — 6,4	come sopra	33,2 × 7,4	clavata, leggermente irregolare
IX	3,2 — 6,4	regolare, filamentosa	22,4 × 8,0	clavata, regolare
X	3,2 — 12,8	irregolarmente rigonfiata, ramificata a setti ravvicinati	assenza	di sporulazione
XI	1,6 — 4,8	regolarmente filamentosa	22,4 × 7,4	ovoidale, clavata, regolare
Non costanti				
I	1,6 — 16,0	rigonfiata a setti ravvicinati e numerosi	assenza	di sporulazione
II	1,6 — 6,4	regolarmente filamentosa	16,0 × 7,4	ovoidale, clavata, leggermente irregolare
III	3,2 — 6,4	irregolarmente ingrossata a setti ravvicinati	33,2 × 9,6	clavata, molto irregolare
IV	1,6 — 6,4	regolarmente filamentosa, ramificata	22,4 × 9,6	clavata, leggermente irregolare

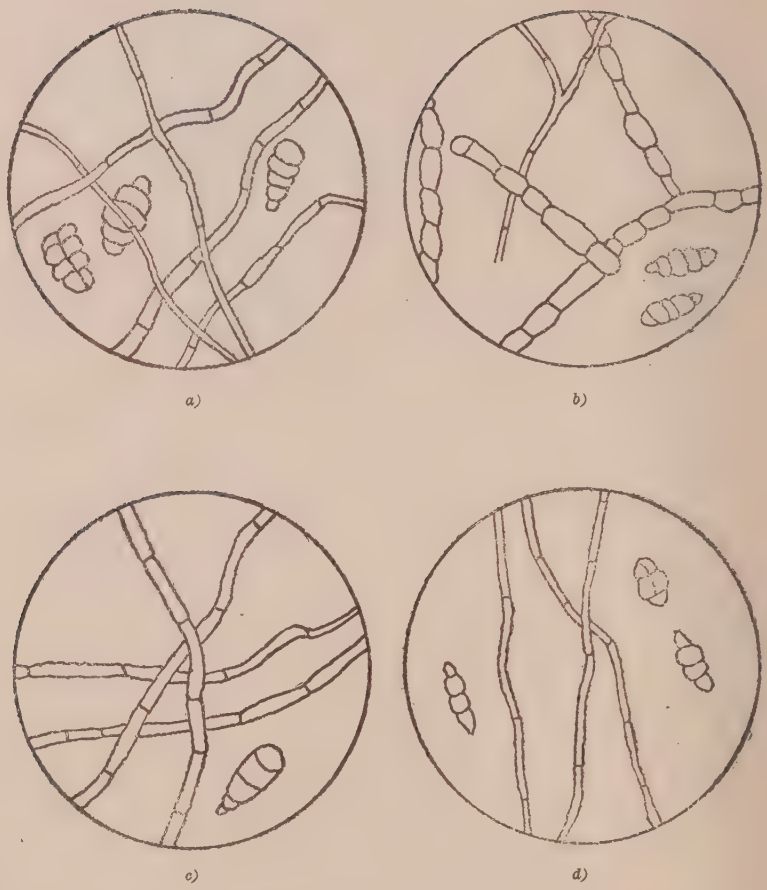
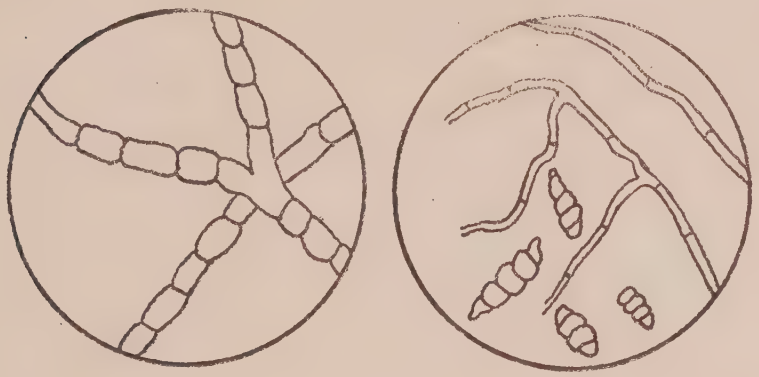


FIG. 2.

Preparati microscopici da colture di Macrosporium commune *Rabh., in soluzioni nutritive di diversa composizione.*

a) sol. VI costante
b) » VIII »
c) sol. IX costante
d) » XI »

L'aspetto di alcune preparazioni microscopiche delle colture risulta dai disegni delle Figure 2 e 3.



a) *b)*

FIG. 3.

Preparati microscopici di colture di M. commune *Rabh. in soluzioni nutritive di diversa composizione.*

a) sol. I non costante
b) » IV »

Risulta dal complesso di questa seconda serie di osservazioni e ricerche che lo sviluppo del *Macrosporium commune* è molto vario nelle differenti soluzioni nutritizie, sia a composizione costante, sia incostante, nelle quali fu cimentato. Mentre lo sviluppo del fungo nella soluzione IX costante può ritenersi normale e tipico, quello ottenuto particolarmente nelle soluzioni VI, VIII, XI costanti e I, IV non costanti ha dato luogo a forme in istati più o meno avanzati d' involuzione.

III.

Ottenutesi adunque forme anormali od involutive, si procedette a prove d' inoculazione di queste in piante sane diverse, comparativamente all'azione eventualmente patogenica della forma normale.

Si prescelsero piante di Fava e Fagiuolo allevate in vasi contenenti parti uguali di terreno del campo sperimentale dei Laboratori e di sabbia d'Arno; nonchè piante di Pomodoro coltivate in piena terra. Le prime inoculazioni vennero eseguite sulle piante di *Vicia Faba* non fruttificate, nel caule tra i 10 e i 15 cm. a partire dalla sua base: più tardi si praticarono, in corrispondenza dello stesso punto, su individui nei quali erano in corso di maturazione i frutti.

Le piante di *Phaseolus vulgaris* inoculate avevano o raggiunto il periodo della fioritura od anche erano fruttificate. Le piante di *Solanum lycopersicum* erano in fruttificazione.

Forma del *Macrosporium,* di controllo, fu quella proveniente dalla soluzione IX costante: forme involute variamente impiegate, secondo quanto risulta dalle Tabelle, furono quelle delle sol. VI, VIII, XI costanti e I, IV non costanti.

I risultati dell'attacco parassitario, giornalmente constatati, sono riassunti nelle Tabelle IV, V e VI seguenti, riferentisi alle singole colture.

Il segno + indica progresso dell'attacco; quello —, sua stazionarietà.

Tabella IV.

COLTURE DI FAVA

(ETA: GIORNI 71 ALLA DATA DELLA PRIMA INOCULAZIONE)

A — non fruttificate.

COLTURE (soluzioni nutritive)	GIORNI DALLA DATA DELL' INOCULAZIONE: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
Costanti	
VI	− + − + − + − − −

TABELLA V.

COLTURE DI FAGIUOLI

(ETÀ: GIORNI 58 ALLA DATA DELLA PRIMA INOCULAZIONE)

A — non fruttificate.

COLTURE (soluzioni nutritive)	GIORNI DALLA DATA DELL'INOCULAZIONE: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80
Costanti	
VI	− + + + − − − + − − − + − + + − + − + − − + − − − − + − − − − − +
XI	− + + + − − + − − + − − + − + − + − + − − + − − − − + − − − − − − + − − − − − − + − − − − − − − − − + − − − − − − − − −
Non costanti	
I	− + + + − − + − − + − − − + − − + − + − + − − + − + − − − − − + + − − − − − − + − − − − − − + − − − − − + − + − − − − − − − − − − − − − − − − − − −
Controllo	
IX	− + − − − + + + + − + + − + + + − + + − + + − + − + − − + − + − − + − + + + + + + − − + − + − + − − − − − − + − − − − − + − + − − − − − − − − + −

B — fruttificate.

Costanti	
VIII	− + + + − − + − + − + − − + − + − − + − − − − − + + − − − − − − + − − − − − − − − − − − − − − − − − − + − − − − − − − − − − − − −
Non costanti	
IV	− + + + − − + − + − + + − + − − − − + − + + + − + + − + + + − − + − + + + + − + + − − − − + − + − − − − − − −
Controllo	
IX	− + + + + + − + + + + + + + − + − + + + + + + + − + + + + + + − − + + + + − −

Tabella VI.

COLTURE DI POMIDORO

(ETÀ: GIORNI 62 ALLA DATA DELL'INOCULAZIONE).

| COLTURE (soluzioni nutritive) | GIORNI DALLA DATA DELL'INOCULAZIONE: 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60 | 61 | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80 |
|---|---|---

Osservazioni. — Sulle colture di Fava non ancora fruttificate l'attacco procedette con intensità crescente nei primi dodici giorni dall' inoculazione; poi esso divenne stazionario e non si ebbe che qualche ripresa a distanza variabile di giorni. Si produsse necrotizzazione di tessuti corticali nella zona adiacente alla puntura ed in parte del cilindro centrale.

Il fatto assume poca estensione in larghezza, molta, invece, in lunghezza; non superandosi però mai la distanza di due internodi.

I fiori andarono progressivamente cadendo e soltanto pochi di essi portarono alla maturazione il frutto.

Eseguendo l' inoculazione del *Macrosporium* sulle piante già in frutto, si notano fenomeni patologici di maggiore intensità e con più gravi conseguenze.

Il progresso dell' attacco per tutte le forme involute o normali si continuò per 49 giorni, dimostrandosi da prima avvizzimento delle foglie, perdita di turgescenza nei frutti; poi allettamento dell'intiera pianta, infine, morte precoce. Le piante non fruttificate ed inoculate si mantennero in vita per una durata di tempo doppia. Esse adunque *reagiscono notevolmente all'attacco del micete:* non così le altre.

Paragonando tuttavia sulle Tabelle i risultati conseguiti con le forme involute e quelli ottenuti con la forma normale, si constata di leggeri che questa *presentasi più virulenta che non le prime.*

Sulle colture di Fagiuoli e su quelle di Pomodoro i fatti non risultarono essenzialmente diversi.

In tutti i casi, è da osservarsi che le *forme involute non hanno perduto la loro capacità patogenica; soltanto essa sembra attenuata, di conseguenza ritardata,* fino a che il fungo non si è restituito al suo equilibrio morfologico e fisiologico nello ambiente uniforme, e potremo anche dire, normale dell'ospite.

Ciò si dimostra con alcune preparazioni microscopiche. degli organi colpiti quali sono riprodotte nella Fig. 4.

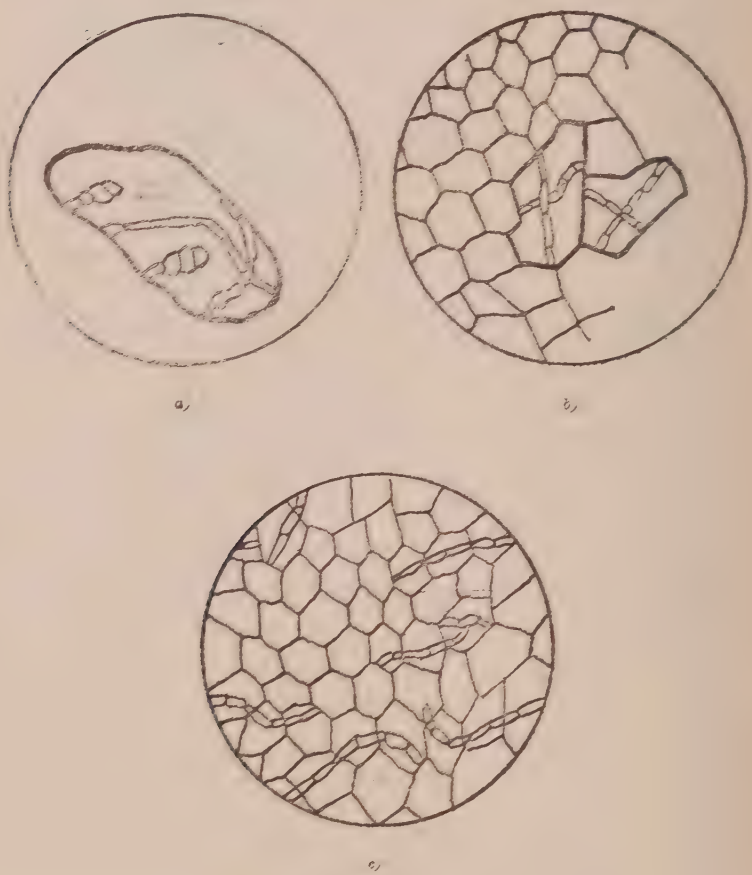


FIG. 4.

M. commune, Rabh.

a) Necrosi nella regione epidermica di piante di Fava.
b) Necrosi nella corteccia primaria di piante di Fava.
c) Micelio intracellulare nel midollo di Fava.

Ivi non sono a distinguersi notevoli differenze nella conformazione del micelio e delle spore sia che trattisi delle forme involute come della normale. Comunque, le variazioni delle forme riscontrate nei tessuti degli ospiti sono molto limitate in confronto di quelle ottenute nelle soluzioni varie nutritive originarie.

All'esame microscopico sono risultate necrotizzazioni nella regione epidermica e della corteccia primaria; lacune in questa, estese in lunghezza più che in larghezza.

Il micelio è intercellulare ed intracellulare; scarseggiante nel cilindro centrale, ma anche presente nelle cellule midollari.

Spore si rivengono, sebbene non costantemente, nelle lacune.

CONCLUSIONI.

1. — *Sono dimostrate relazioni tra l'involuzionismo delle forme di* Macrosporium commune, *Rabh. e la sua attività patogenica o virulenza.*

2. — *Le manifestazioni di questa si palesano attenuate per le forme involute in confronto della normale.*

3. — *L'attenuazione della virulenza stessa si manifesta con il ritardo dell'attacco parassitario; questo però conduce alle conseguenze stesse della forma normalmente attiva, entro il tempo in cui si compie il ciclo di sviluppo della pianta ospite e, cioè, alle medesime alterazioni anatomiche ed anche alla morte.*

4. — *La pianta attaccata può reagire sia all'azione della forma normale, come a quella delle forme involute; ma queste — originate, sia dalla singolare composizione del mezzo nutritivo, sia dal suo invecchiamento — non perdono, nei casi esaminati, la loro virulenza.*

5. — *La detta reazione varia con gli stadi di sviluppo dell'ospite; è minore durante gli ultimi, cioè, verso quelli della maturazione del frutto, maggiore durante il periodo della massima attività formativa e di accrescimento. In ogni caso però sembra che, permanendo le stesse condizioni ambientali esteriori, vi sia compenso tra ritardo nell'attacco parassitario e le sue conseguenze patologiche nel senso che all'attenuazione si correlaziona un esaltamento successivo della virulenza.*

6. — *Dovrebbesi dedurre da tutto quanto è stato rilevato — e limitatamente alle prove istituite — che, a prescindere da altri fattori estrinseci del determinismo dei fenomeni fitopatologici, alle variazioni di forma dipendenti dalla nutrizione e dall'invecchiamento delle colture non possa ascriversi un essenziale mutamento delle manifestazioni patogeniche quanto meno del* Macrosporium commune. *Rabh.*

Dal R. Osservatorio Fitopatologico e dal Laboratorio di Patologia Vegetale del R. Istituto Superiore Agrario di Pisa, gennaio 1929 - VII.